

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-173361

(43)Date of publication of application : 08.07.1997

(51)Int.Cl.

A61F 2/06  
A61L 27/00

(21)Application number : 07-341063

(71)Applicant : SUMITOMO BAKELITE CO LTD

(22)Date of filing : 27.12.1995

(72)Inventor : ASAI HIDEAKI

## (54) ARTIFICIAL BLOOD VESSEL AND ITS PRODUCTION

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To make it possible to obtain the lumen surface of an artificial blood vessel having an antithrombotic property and tissue adaptability in combination without the dislodgment of an elastin layer even under blood bloodstream for a long time by providing the lumen surface of a tubular artificial blood vessel base material with an albumin layer and the elastin layer.

SOLUTION: A soln. of albumin is packed into the lumen of the tubular artificial blood vessel base material and heat of 50 to 80° C is applied thereon while the base material is kept rotated; thereafter, the albumin soln. is discharged to form the crosslinked matter of the albumin within the wall surface of the tubular artificial blood vessel base material and to simultaneously built the albumin layer on the lumen surface of the artificial blood tube base material. An elastin soln. prepd. by adding water-soluble elastin to a buffer soln. of pH=4 to 7 is filled into the lumen of such artificial blood tube base material and the artificial blood tube base material is rotated in a circumferential direction while the base material is held horizontal in the major axis direction to built the elastin layer formed by subjecting the elastin to core servation on the albumin layer. The elastin layer is thereafter crosslinked, by which the albumin layer and the elastic layer are built on the lumen surface of the artificial blood tube base material.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 12.06.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3573554

[Date of registration] 09.07.2004

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-173361

(43) 公開日 平成9年(1997)7月8日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 F 2/06			A 6 1 F 2/06	
A 6 1 L 27/00			A 6 1 L 27/00	P

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平7-341063

(22) 出願日 平成7年(1995)12月27日

(71) 出願人 000002141

住友ベークライト株式会社

東京都品川区東品川2丁目5番8号

(72) 発明者 浅井 秀昭

秋田市土崎港相築町字中島下27-4 秋田

住友ベーク株式会社内

(54) 【発明の名称】 人工血管及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 生体血管の内弾性板に類似下構造を内腔面に形成することによって、血液の凝固と血漿蛋白の付着及び細胞の過剰な成長を抑制し、小口径でも内膜肥厚を起こさず、高い開存性を有する人工血管を提供することにある。

【解決手段】 管状の合成樹脂からなる人工血管基材の内腔面に、アルブミンを塗布し、加熱するか又は加熱後更に架橋剤で架橋して構築したアルブミン層上に水溶性エラスチンをコアセルベーションさせ架橋剤によって固定した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 合成樹脂を管状にして作製した人工血管基材の内腔面に、水溶性エラスチンをコアセルベーション（凝集）させ架橋剤によって架橋して得られるエラスチン層を有するか、又は架橋剤によって架橋されたゼラチン層もしくはコラーゲン層を設け、更にその上に水溶性エラスチンをコアセルベーションさせ架橋剤によって架橋して形成されたエラスチン層を有することを特徴とする人工血管。

【請求項2】 水溶性エラスチンが、動物由来もしくはヒト由来のエラスチンを熱酸処理して得られる $\alpha$ -エラスチンもしくは $\beta$ -エラスチン、エラスチンをアルカリエタノール処理して得られる $\kappa$ -エラスチン、又はエラスチンをペプシンもしくはエラスターゼによって酵素処理して得られる水溶性エラスチンであることを特徴とする、請求項1記載の人工血管。

【請求項3】 水溶性エラスチンの架橋剤が、グルタルアルデヒド、ジアルデヒドスターチ、もしくは水溶性エポキシ化合物であることを特徴とする、請求項1記載の人工血管。

【請求項4】 ゼラチン層もしくはコラーゲン層の架橋剤が、グルタルアルデヒド、ジアルデヒドスターチ、もしくは水溶性エポキシ化合物であることを特徴とする、請求項1記載の人工血管。

【請求項5】 人工血管基材が、合成樹脂を繊維状にし平織りもしくはメリヤス編みにて管状としたもの、合成樹脂を繊維状にしマンドレル上に巻取り積層して不織性の管状としたもの、合成樹脂を押出し成形によって管状としたもの、合成樹脂に粒状塩化ナトリウム等の水溶性物質を加え押出し成形によって管状とした後、これを水中に浸すことによって多孔性構造としたもの、又は、合成樹脂を押出し成形によって管状とした後、延伸を加えて多孔性構造としたもののいずれかであることを特徴とする、請求項1記載の人工血管。

【請求項6】 人工血管基材を形成する合成樹脂が、ポリウレタン、ポリエステル、もしくはポリテトラフルオロエチレンであることを特徴とする、請求項5記載の人工血管。

【請求項7】 合成樹脂によって作製した人工血管基材の内腔に、水溶性エラスチンを $\text{pH}=4\sim7$ の緩衝溶液に対して濃度が $1\sim30\text{wt}\%$ になる割合で加えた水溶性エラスチンの緩衝溶液を、 $4^\circ\text{C}$ 以上 $35^\circ\text{C}$ 未満にて充填し、人工血管基材を長手方向に水平に保ちながら、 $35^\circ\text{C}$ 以上 $70^\circ\text{C}$ 以下にて $0.1\sim10\text{rpm}$ の速度で人工血管基材の円周方向に回転させて内腔面上にエラスチンをコアセルベーションさせた層を構築した後、内腔の溶液を排出し、次に水溶性架橋剤を $\text{pH}=4\sim7$ の緩衝溶液に対して濃度が $0.1\sim10\text{wt}\%$ になる割合で溶解した架橋剤溶液を内腔に入れて、水溶性エラスチンのコアセルベート層を架橋させることによって、人工血管

の内腔面にエラスチン層を構築することを特徴とする人工血管の製造方法。

【請求項8】 合成樹脂によって作成した人工血管基材を、ゼラチンもしくはコラーゲンを $\text{pH}=3\sim8$ の緩衝溶液に対して濃度が $1\sim10\text{wt}\%$ になる割合で加えた溶液中に浸すことによって、人工血管基材の繊維間もしくは多孔性人工血管基材の孔中にゼラチンもしくはコラーゲンを含浸させ、更に人工血管基材の内腔面上にもゼラチン層もしくはコラーゲン層を形成させ、架橋剤にてゼラチン層もしくはコラーゲン層を架橋させた後、該人工血管基材の内腔に、水溶性エラスチンを $\text{pH}=4\sim7$ の緩衝溶液に対して濃度が $1\sim30\text{wt}\%$ になる割合で加えた水溶性エラスチンの緩衝溶液を、 $4^\circ\text{C}$ 以上 $35^\circ\text{C}$ 未満にて充填し、人工血管基材を長手方向に水平に保ちながら、 $35^\circ\text{C}$ 以上 $70^\circ\text{C}$ 以下にて $0.1\sim10\text{rpm}$ の速度で人工血管基材の円周方向に回転させて、内腔面上にエラスチンをコアセルベーションさせた層を構築し、内腔の溶液を排出し、次に水溶性架橋剤を $\text{pH}=4\sim7$ の緩衝溶液に対して濃度が $0.1\sim10\text{wt}\%$ になる割合で溶解した架橋剤溶液を内腔に入れて、水溶性エラスチンのコアセルベート層を架橋させることによって、人工血管の内腔面にエラスチン層を構築することを特徴とする人工血管の製造方法。

【請求項9】 人工血管の基材として、合成樹脂を繊維状にし平織りもしくはメリヤス織りにて管状としたもの、合成樹脂を繊維状にしマンドレル上に巻取り積層して不織性の管状としたもの、合成樹脂を押出し成形によって管状としたもの、合成樹脂に粒状塩化ナトリウム等の水溶性物質を加え押出し成形によって管状とした後、これを水中に浸すことによって多孔性構造としたもの、又は、合成樹脂を押出し成形によって管状とした後、延伸することによって多孔性構造としたもののいずれかを用いることを特徴とする、請求項7又は8記載の人工血管の製造方法。

【請求項10】 人工血管の基材を作製する合成樹脂として、ポリウレタン、ポリエステル、もしくはポリテトラフルオロエチレンを用いることを特徴とする、請求項9記載の人工血管の製造方法。

【請求項11】 水溶性エラスチンを、グルタルアルデヒド、ジアルデヒドスターチ、もしくは水溶性エポキシ化合物によって架橋することを特徴とする、請求項7又は8記載の人工血管の製造方法。

【請求項12】 水溶性エラスチンとして、動物由来もしくはヒト由来のエラスチンを熱酸処理し得られる $\alpha$ -エラスチンもしくは $\beta$ -エラスチン、エラスチンをアルカリエタノール処理して得られる $\kappa$ -エラスチン、又はエラスチンをペプシンもしくはエラスターゼによって処理して得られる水溶性エラスチンを用いることを特徴とする、請求項7又は8記載の人工血管の製造方法。

【発明の詳細な説明】



内弾性板に類似下構造を人工血管の内腔面に形成することによって、血液の凝固と血漿蛋白の付着及び細胞の過剰な成長を制御し、小口径でも内膜肥厚を起こさず、高い開存性を有する人工血管及びその製造方法に関するものである。

#### 【0002】

【従来の技術】大腿動脈から膝窩動脈、更に脛骨、腓骨動脈を満足に再建できる内径3～6mmの小口径人工血管は未だに無く、この領域の動脈再建には自己静脈が主に使用されているのが現状である。小口径人工血管では、血流量が少なく血栓閉塞が生じ易いため、植え込み初期の優れた抗血栓性が要求される。また、植え込み後数ヶ月で宿主動脈や周辺組織から新生の細胞や組織が伸展してくるため、これらを安定して生着させることのできる足場を提供する材料であることが重要である。例えば膝窩動脈再建用のテフロン製人工血管は、疎水性が高く、血液や蛋白質を付着しない為、抗血栓性は良好であるが、細胞や組織が生着する足場が無い為、パンヌスや内膜肥厚を生じ、閉塞し易いという欠点がある。

【0003】また、ゼラチンやコラーゲンでシールしたポリエステル製の人工血管は、細胞や組織の足場は有るが、抗血栓性が悪く植え込み初期で血栓閉塞してしまうという欠点を有している。そこで、我々はウシの内胸動脈やヒトの臍帯動脈の内弾性板に存在するエラスチンが抗血栓性と組織適合性に優れていることに着目し、エラスチンをコアセルベーションさせた後架橋することで、内弾性板に存在する構造と同様の三次元構造を持つエラスチン層が構築できることを見出し、先に特願平06-171095号にて、合成樹脂からなる人工血管の内腔面にエラスチンを固定した人工血管およびその製造方法を開示した。

【0004】しかしながら、このような方法ではエラスチンが脱離し易く、長期間血流下にさらされると脱離部から血栓形成や内膜肥厚が生じ易いという問題を有している。また、他にエラスチンを用いた人工血管では、特開平03-41963号公報や特開平03-254753号公報などがあるが、これらは合成高分子中やフィブリン蛋白中にエラスチンを混合し成形したものであるため、構築された血液接触面はエラスチンと合成樹脂またはフィブリン蛋白質との混合物表面であり、エラスチンを主成分とする生体血管の内弾性板表面とは大きく構造が異なるし、エラスチン自体の三次元構造も内弾性板中の構造と全く異なるため、本来、内胸動脈表面や臍帯動脈表面が示す血液適合性や組織適合性は得られない。

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】先に、特願平06-171095号で開示した人工血管及びその製造方法においては、人工血管基材である管状の合成樹脂とエラスチン又は人工血管基材の内腔面上に設けたコラーゲン層もしくはゼラチン層とエラスチンとの親和性が悪く、血流

下に長期間さらされた場合、エラスチン層が脱離し、エラスチン脱離部から血栓形成が生じたり細胞の過剰成長が生じ、結果として人工血管の内膜肥厚や狭窄、閉塞を引き起こす可能性があった。本発明は、従来のこのような問題点を解決しようとするもので、長期間血流下にあってもエラスチン層が脱離せず、抗血栓性と組織適合性を兼ね備えた人工血管内腔面を有し優れた開存性を有する人工血管を提供することを目的とするものである。

#### 【0006】

10. 【課題を解決するための手段】本発明は、先に特願平06-171095号で開示した人工血管及びその製造方法において、管状の合成樹脂からなる人工血管基材の内腔面上に直接又は予め構築したコラーゲン層もしくはゼラチン層の上にエラスチン層を構築するのではなく、管状の合成樹脂からなる人工血管基材に予め熱又は架橋剤によって架橋されたアルブミン層を設け、この上にエラスチン層を設けることでエラスチン層の人工血管基材への接着を改善しエラスチンの効果を長期間持続させることを特徴とする人工血管及びその製造方法に関するものである。すなわち、管状の人工血管基材の内腔面上に少なくともアルブミン層とエラスチン層の2層を有することを特徴とする人工血管である。

20. 【0007】本発明者らは、物質間の親和性は、物質間の疎水-疎水相互作用の強度又は親水-親水相互作用の強度によって支配されることに注目し、エラスチンがそのアミノ酸組成において非極性アミノ酸であるグリシン、アラニン、プロリン、バリンを多く含み、極性アミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン、リジン、ヒスチジン、アルギニンをわずかにしか含まない疎水性の高い蛋白質であり、(Norman T. Soskel, Terril B. Wolf, and Lawrence B. Sandberg, METHOD IN ENZYMOLOGY, Vol.144 196-214 (1987))、同様に疎水性蛋白質であるアルブミンと疎水-疎水相互作用で良好な親和性を示すことを見だし、更に検討を進めて本発明を完成するに至った。

#### 【0008】

30. 【発明の実施の形態】本発明で管状の人工血管基材の壁面内及び内腔面上にアルブミン層を構築する工程において、アルブミン溶液に加える温度は50～80℃が好ましく、回転速度は用いるアルブミン溶液の濃度にもよるが、1～100rpmが好ましい。この理由は、温度が低すぎるとアルブミンが架橋されずアルブミン層が得られないし、温度が高過ぎるとアルブミン溶液中に気泡が発生しやすく構築したアルブミン層表面に凹凸が生じるためである。また、回転速度が1rpm未満であるとアルブミン溶液が人工血管基材の内腔の一部分に溜まってしまいうため人工血管基材の内腔面上に均一なアルブミン層を形成することができないし、回転速度が100rpmより速いと、アルブミン溶液が人工血管基材の外壁面に移行し、人工血管基材の内腔表面上に十分な厚さのア

ルブミン層が形成できないためである。

【0009】また、本発明で管状の人工血管基材の内腔面上にアルブミン層を構築する工程において、アルブミンを人工血管基材の壁面内及び内腔表面に含浸もしくはコーティングした後、加熱する時間は、アルブミン溶液の濃度にもよるが1分～5時間が好ましい。この理由は加熱時間が短いと十分にアルブミンが架橋されないし、時間が長すぎると架橋アルブミンが熱分解してしまうためである。また、本発明で用いることのできるアルブミンは、特に限定はしないがウシ血清アルブミン、ヒト血漿アルブミンなどの動物由来アルブミンが使用できる。また、本発明でアルブミンを溶解する水又は緩衝溶液は特に限定はしないが、血液の流路として生体内に留置するためエンドトキシンなどの発熱性物資を含有しないものが望ましい。

【0010】また、本発明で用いることのできるアルブミン溶液中のアルブミン濃度は、水又は緩衝溶液に対して1～50重量%であることが好ましい。この理由は、濃度が低すぎると加熱してもアルブミンの架橋物が得られないし、得られても架橋物中のアルブミン密度が低い。ため得られたアルブミン層の強度が低く人工血管として使用できないし、また、濃度が高すぎると溶液の粘度が高くなり過ぎ管状の人工血管基材の壁面内に充分含浸することができないし、管状の人工血管基材の内腔面上に均一な架橋層を構築することができないためである。

【0011】また、本発明の各工程においてアルブミン架橋物やアルブミン層、あるいはコアセルベーションさせたエラスチン層を架橋させる架橋剤としては、ジアルデヒド化合物や水溶性多官能性エポキシ化合物が利用できるが、中でも水溶性エポキシ化合物は、アミノ基とカルボキシル基の両方の官能基と反応でき、また、架橋後は柔らかい蛋白層を与えるため生体血管に近いコンプライアンスを得ることができ特に好ましく、例えばデナコールEX-614、デナコールEX-614B、デナコールEX-521（ナガセ化成工業（株）製）などが使用できる。

【0012】また、本発明で用いることのできるエラスチンは特に限定しないが、ブタ大動脈由来エラスチン、ウシ頸動脈由来エラスチン、ウシ肺由来エラスチン、ウシ大動脈由来エラスチン、ヒト肺由来エラスチン、ヒト大動脈由来エラスチン、ヒト臍帯動脈由来エラスチンなどのエラスチン、又はこれらを熱酸処理によって水溶性にした $\alpha$ -エラスチンもしくは $\beta$ -エラスチン、アルカリエタノール処理によって水溶性にした $\kappa$ -エラスチン、ペプシン、エラスターゼなどの酵素で処理し水溶性にしたエラスチンタンパク質などが挙げられる。中でも組織適合性と抗血栓性の点でヒト大動脈由来エラスチンもしくはヒト臍帯動脈由来エラスチンが望ましく、その理由の詳細は不明であるが、エラスチンはその由来部位と動物の種類によって若干アミノ酸組成が異なり、ヒト

大動脈由来エラスチンもしくはヒト臍帯動脈由来エラスチンの有するアミノ酸組成では特に架橋後の表面を平滑にできるため、血液の凝固活性を引き起こし難いと考えられる。

【0013】また、本発明で使用する管状の人工血管基材は、血液の流路としてマクロファージなどの放出する過酸化脂質分解酵素や加水分解酵素の存在する生体内に長期間留置するため、生体内で酵素などにより分解されず、かつ毒性がなく、また血圧の変動に充分耐えられる材料であることが必要で、その材料としては、ポリウレタン、ポリエステル、ポリテトラフルオロエチレンなどの材料が好ましい。また、管状の合成樹脂の内腔面にアルブミンを強固に固定するためには、内腔面の構造は多孔性、繊維を編んだもの、もしくは繊維が積み重なった構造のものが好ましい。その理由はこのような構造の材料ではアルブミンが内腔面の孔や繊維間に入り込み強いアンカー効果が得られるためである。

【0014】また、管状の人工血管基材の内腔面上に設けたアルブミン層上に水溶性エラスチンをコアセルベーションさせる工程において、水溶性エラスチンをコアセルベーションさせる緩衝溶液はpH=4～7の範囲のものであれば良く特に限定はしない。中でもpH=5で充分な緩衝能を持つクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液、クエン酸/水酸化ナトリウム緩衝液、酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸二水素カリウム/リン酸水素二ナトリウム緩衝液、コハク酸/水酸化ナトリウム緩衝液などが水溶性エラスチンをコアセルベーションさせるのに適している。これは水溶性エラスチンの等電点がこの付近にあるため電氣的に中和されたエラスチンが疎水-疎水相互作用によって会合し、凝集を生じやすく、コアセルベーションが安定するためであると考えられる。

【0015】また、水溶性エラスチンを緩衝溶液に溶解する量は、pH=4～7の緩衝液に対して1～30重量%の範囲で用いることができる。この理由は、エラスチンの濃度が1重量%より低すぎると水溶性エラスチンがコアセルベーションし難く、30重量%より濃度が高すぎると、溶液中でエラスチンの凝集体が形成しているためか人工血管の内腔面上に形成されるエラスチン層に凹凸が形成してしまうためである。また、水溶性エラスチンをコアセルベーションさせる温度は、35℃～70℃が好ましい。この理由は35℃未満の低温では水溶性エラスチンをコアセルベーションさせることができないし、70℃より高い温度では水溶性エラスチンが熱変性しやすいためである。

【0016】また、水溶性エラスチンをアルブミン層を設けた人工血管基材の内腔面上に均一にコアセルベーションさせるためには、作製する人工血管の内径にもよるが、エラスチン水溶液を充填した人工血管を長手方向に水平に保ちながら、内径2～6mmφの人工血管では円



周方向に0.1~10rpmの回転速度で静かに回転させるのが好ましい。この理由は、エラスチン層形成の際に、エラスチンを35℃以上の温度で静置すると、重力方向にエラスチンがコアセルベーションしてコアセルベート（凝集体）を形成する特性を利用するため、回転速度が速すぎると内腔に充填した水溶性エラスチン溶液が攪拌されてしまい、エラスチンの凝集を妨げてしまうし、回転速度が遅すぎるとエラスチンのコアセルベーション速度よりも人工血管基材内腔面の移動速度が遅くなるため、人工血管の内腔面に均一なエラスチン層を形成することができないためである。

【0017】また、管状の人工血管基材の壁面内及び内腔面上にアルブミン層とエラスチン層を形成した後、水又は緩衝溶液もしくは生理食塩水に溶解した脂肪酸多価アルコール溶液を含浸する工程において用いることのできる脂肪酸多価アルコールは、特に限定はしないがグリセリンが好ましい。この理由は、グリセリンは本来血液中に存在する成分であり、人工血管を生体内に植え込んだ後血液中に溶出しても生体に悪影響を与えないためである。

【0018】また、脂肪酸多価アルコールを溶解する緩衝溶液は、特に限定はしないが、リン酸緩衝液、リン酸二水素カリウム／リン酸水素二ナトリウム緩衝液などが好ましい。この理由はこれらの緩衝溶液の塩は、微量を生体内に入れても生体に悪影響を与えないからである。また、脂肪酸多価アルコール溶液の濃度は、水又は緩衝溶液もしくは生理食塩水に対して0.5~20重量%が好ましい。この理由は、濃度が0.5重量%より低いと充分乾燥した人工血管を柔軟な状態に維持できないし、濃度が20重量%より高いと乾燥後でも取扱性が悪いし、生体内に植え込んだ場合血液中に多量の脂肪酸多価アルコールが溶出し、生体に悪影響を与えるためである。

【0019】

【実施例】以下に、実施例によって本発明の効果を説明する。

【実施例、及び比較例】

<溶液の調製及び人工血管の作製>ウシ血清アルブミン粉末（和光純薬製）2gを純水10mlに室温にて溶解し、アルブミン溶液を作製した。ポリエチレンテレフタレート（PET）を内径3mmφの管状に縮んだ人工血管基材を長さ5cmに切断し、内径4.5mmφ、長さ6cmのガラス製試験管に装着した。人工血管基材を装着したガラス製試験管内にアルブミン溶液0.4mlを充填し、シリコン栓を取付け、更にガラス試験管をモーターによって回転できるようにしたステンレス製の管状の治具の中に挿入し装着した。モーターのチャックに治具を取付け、モーターを10rpmの速度で回転させながら20分間全体を60℃に加熱した後、モーターを止めガラス管内のアルブミン溶液を排出し人工血管基材内腔にアルブミン層を構築した。

【0020】次にグルタルアルデヒド20重量%溶液（和光純薬製）5mlに純水を加え100mlとした架橋剤溶液0.4mlを上記で得られた人工血管内腔に充填し、50℃にて12時間架橋し、架橋剤を排出した。続いて、ウシ首靱帯製α-エラスチン（エラスチン・プロダクツ社製）150mgをpH=5.2に調製したリン酸二水素カリウム／リン酸水素二ナトリウム緩衝液1.5mlに溶解したエラスチン水溶液0.4mlを上記で得られた人工血管内腔に充填し、シリコン栓を取付け、モーターによって回転できるようにしたステンレス製の管状の治具の中に挿入し装着した。

【0021】モーターのチャックに治具を取付け5rpmの速度でモーターを回転させながら60℃に12時間加熱しアルブミン層を内腔に固定した人工血管の内腔面上にエラスチンをコアセルベーションさせた。モーターの回転を止め、管内の溶液を捨て、0.4mgの水溶性エポキシ架橋剤（デナコールEX-814B、ナガセ化成工業（株）製）をpH=7.0のリン酸緩衝液0.4mlに溶解した水溶液を上記で得られた人工血管内腔に充填し、5rpmの速度でモーターを回転させながら60℃にて24時間架橋反応を行い、人工血管基材内腔面にアルブミン層とエラスチン層を構築し、1gのグリセリン（和光純薬（株）製 血清用）を生理食塩水（大塚製薬（株）製）100mlに溶解した溶液に5時間浸し、本発明の人工血管を得た。

【0022】また、比較例としてポリエチレンテレフタレート（PET）を内径3mmφの管状に縮んだ人工血管基材を長さ5cmに切断し、内径4.5mmφ、長さ6cmのガラス製試験管に装着し、ウシ骨製ゼラチン粉末（和光純薬製）8mgをリン酸緩衝液0.4mlに溶解した水溶液を30℃にて充填し、人工血管基材に充分含浸し、溶液を排出後、4℃に3時間保ち、ゼラチン層を人工血管内腔面に構築した。次にグルタルアルデヒド20重量%溶液（和光純薬製）5mlに純水を加え100mlとした架橋剤溶液0.4mlを上記で得られた人工血管内腔に充填し、4℃にて12時間架橋し、架橋剤を排出した。

【0023】続いて、ウシ首靱帯製α-エラスチン（エラスチン・プロダクツ社製）150mgをpH=5.2に調製したリン酸二水素カリウム／リン酸水素二ナトリウム緩衝液0.4mlに溶解したエラスチン水溶液を上記で得られた人工血管内腔に充填し、シリコン栓を取付け、モーターによって回転できるようにした治具の中に挿入し装着した。

【0024】モーターのチャックに治具を取付け5rpmの速度でモーターを回転させながら60℃に12時間加熱しゼラチン層を内腔に固定した人工血管の内腔面上にエラスチンをコアセルベーションさせた。モーターの回転を止め、管内の溶液を捨て、0.4mgの水溶性エポキシ架橋剤（デナコールEX-614B、ナガセ化成

工業(株)製)を $\text{pH}=7.0$ のリン酸緩衝液 $0.4\text{m}$ に溶解した水溶液を上記で得られた人工血管内腔に充填し、 $5\text{rpm}$ の速度でモーターを回転させながら $60^\circ\text{C}$ にて24時間架橋反応を行い、人工血管基材の内腔面にゼラチン層とエラスチン層を構築し、 $1\text{g}$ のグリセリン(和光純薬製 血清用)を生理食塩水(大塚製薬製) $100\text{ml}$ に溶解した溶液に5時間浸し、比較例の人工血管を作製した。

【0025】<動物実験>体重 $11\text{kg}$ のビーグル成犬(雌性)1頭をアトロピンにて前処理し、導入麻酔をフルニトラゼパム $0.1\text{mg/kg}$ 、ケタミン $3\text{mg/kg}$ の静注によって実施した。イヌを手術台に固定後、ヘパリン( $100\text{IU/kg}$ )を静注し、フローセンによる麻酔を維持しながら、右頸部を切開して右総頸動脈を長さ約 $5\text{cm}$ にわたって切除し、ここに7-0ポリプロピレン製縫合糸を用い端々吻合にて内径 $3\text{mm}\phi\times$ 長さ $5\text{cm}$ の本発明のアルブミン層とエラスチン層を有する人工血管を植え込んだ。また全く同様に左頸部を切開し、左総頸動脈を長さ約 $5\text{cm}$ にわたって切除し、比較例の内径 $3\text{mm}\phi\times$ 長さ $5\text{cm}$ のエラスチン層のみを有する人工血管を端々吻合にて植え込んだ。

【0026】術後、抗凝固薬は一切使用せず12ヶ月間イヌを飼育した。12ヶ月後、イヌをアトロピンにて前処理し、導入麻酔をフルニトラゼパム $0.1\text{mg/kg}$ 、ケタミン $3\text{mg/kg}$ の静注によって実施した。イヌを手術台に固定後、ヘパリン( $100\text{IU/kg}$ )を静注し、フローセンによる麻酔を維持しながら、左右頸部を切開して左右両総頸動脈に植え込んだ両人工血管を宿主動脈と共に摘出した。直ちに、注射器を用い $500\text{IU/ml}$ のヘパリンを溶解した生理食塩水にて人工血管の内外面を静かに洗浄し、血液を洗い流し、人工血管を縦に切り開き肉眼的に観察し、本発明のアルブミン層とエラスチン層を有する人工血管と比較例のエラスチン層のみを有する人工血管との比較を行った。

【0027】次に両人工血管を縦に2つ割にし、一方を冷蔵庫中で4%ホルマリンの中性緩衝溶液に浸し固定した後、光学顕微鏡用試料とした。残りの試料は、1%グルタルアルデヒドの中性緩衝溶液及び3%グルタルアルデヒドの中性緩衝溶液に冷蔵庫中で浸して固定し、電子顕微鏡用試料とした。光学顕微鏡用試料は中枢側吻合部、中央部、末梢側吻合部の3つに切断し、ホルマリンを洗浄した後、パラフィン包埋し、各部位からマイクロームによって切片を切り出しプレバートとし、エラスチカワンギーソン染色及びヘマトキシリン-エオジン染色をおこなった。

【0028】光学顕微鏡観察は、中枢側吻合部、中央部、末梢側吻合部でそれぞれ20倍と100倍にて行い、エラスチカワンギーソン染色でエラスチン層の脱離の程度を評価し、ヘマトキシリン-エオジン染色で細胞と組織の伸展の程度と内臓肥厚の程度を評価した。評価は全て本発明のアルブミン層とエラスチン層を有する人工血管と比較例のエラスチン層のみを有する人工血管との比較評価とした。

【0029】また、電子顕微鏡観察用試料はグルタルアルデヒド固定後、中枢側吻合部、中央部、末梢側吻合部の3つに分け、1%オスミウム酸と1%タンニン酸で導電染色を行った後、臨界点乾燥によって乾燥し、試料台に固定してPd-Ptを蒸着した。電子顕微鏡観察は200倍と1000倍にて、本発明のアルブミン層とエラスチン層を有する人工血管と比較例のエラスチン層のみを有する人工血管の内腔面の状態を比較評価した。尚、光学顕微鏡はニコン社製DIAPHOT-TMD型を使用し、走査型電子顕微鏡は日立S-800型を使用した。実施例及び比較例の各人工血管の評価結果は、表1及び表2に示した通りであった。

【0030】

【表1】

評価項目	実施例	比較例
内腔的観察結果	内腔面は平滑で突起のある白色で、血栓の付着は見られず、宿主血管と人工血管との吻合部は、中根側、末梢側ともに縫合糸が通けて見え内腔腔隙は見られなかった。	内腔面中央部は平滑で突起のある白色を呈している部分もあったが、所々に血栓の付着が見られた。宿主血管との吻合部では、人工血管内腔の約30%程度の狭窄が見られた。
光学的観察結果 (ニラステカ ワンギーソン 染色結果)	人工血管全体にわたり、人工血管基材の上に黒紫色に染色された1727層が見られ、大きな1727脱離部は認められなかった。	中央部の所々に黒紫に染色され無い1727脱離箇所が認められた。狭窄の見られた宿主血管との吻合部では、特に1727脱離部が多く認められた。
光学的観察結果 (組織学的 評価)	中央部は、5~10 $\mu$ mの非細胞性の増殖層が見られた。中根側及び末梢側吻合部では、宿主血管から伸展したほぼ単層の細胞層が認められ、約20 $\mu$ mの薄い層を形成していた。	中央部では、所々に約100~300 $\mu$ mの細胞と細胞からなる層が認められた。中根側及び末梢側吻合部では最大1mm程度の内腔腔隙が見られた。

【0031】

【表2】

\*

\*

評価項目	実施例	比較例
透射電子顕微鏡 観察結果	中央部では、血栓成分やフィブリン繊維、細胞などは見られず、血漿蛋白と思われる成分の付着が認められるのみであった。 中根側及び末梢側吻合部では宿主血管から5~10mm程度まで血管内皮細胞様の細胞の伸展が見られた。	中央部では、血漿蛋白と思われる成分の付着が主に認められたが、所々に血球成分を含んだフィブリン繊維が見られた。 中根側及び末梢側吻合部では肥厚した表面に血管内皮細胞様の細胞が見られたが、その下には気質化した血栓層と思われる厚い細胞層が見られ、1727層が剥離し1727層が血液と接触したと考えられた。

【0032】

【発明の効果】 以上のように、アルブミン層を設けた人工血管基材内腔面上にエラスチンをコアセルベーションさせ、架橋剤によって架橋した人工血管は、アルブミン

とエラスチンとの接着性が良好であるため、生体内植え込み後でもエラスチン層が剥離することがなく、長期間にわたり優れた抗血栓性と組織適合性を併せ持ち、人工血管内腔面での血栓形成や吻合部での組織や細胞の過剰



(8)

特開平9-173361

13

成長が全くないため、従来にない内径4mm以下の小口径でも長期間にわたる開存性が期待できる人工血管で

14

あることが明白になった。



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>A61L 27/00, 31/00</b>	<b>A3</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 99/11297</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 11 March 1999 (11.03.99)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/GB98/02399 <b>(22) International Filing Date:</b> 19 August 1998 (19.08.98) <b>(30) Priority Data:</b> 9717433.8      19 August 1997 (19.08.97)      GB <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> UNIVERSITY OF NOTTINGHAM [GB/GB]; Lenton Lodge, University Park, Nottingham NG7 2RD (GB). <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> CORDEN, Thomas, Joseph [GB/GB]; School of Mechanical, Materials, Manufacturing Engineering and Management, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD (GB). DOWNES, Sandra [GB/GB]; School of Biomedical Sciences, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD (GB). FISHER, Sheila, Eunice [GB/GB]; (Queen's Medical Centre), Maxillofacial Unit, 30 The Ropewalk, Nottingham NG1 5DW (GB). JONES, Ivor, Arthur [GB/GB]; School of Mechanical, Materials, Manufacturing Engineering and Management, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD (GB). RUDD, Christopher, Douglas [GB/GB]; School of Mechanical, Materials, Manufacturing Engineering and		Management, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD (GB). <b>(74) Agent:</b> MARKGRAAF PATENTS LIMITED; The Crescent, 54 Blossom Street, York YO24 1AP (GB). <b>(81) Designated States:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). <b>Published</b> <i>With international search report.</i> <b>(88) Date of publication of the international search report:</b> 10 June 1999 (10.06.99)
<b>(54) Title:</b> BIODEGRADABLE COMPOSITES <b>(57) Abstract</b> <p>A fully biodegradable fibre reinforced composite adapted for use as a medical implant which is shaped and processed by means of a resin reaction injection transfer molding process adapted for predetermining shape, physical properties and degradation profile, shaped preform and/or composition for preparation of the shaped composite, process for the production of the shaped composite comprising obtaining a shaped preform and impregnating with resin with simultaneous processing thereof, shaped composite comprising thermoplastic matrix and fibres adapted for use as a medical implant, characterised by a differential degradation of matrix with respect to fibres adapted to degrade via an intermediate shaped structure comprising residual porous matrix or residual fibre form respectively and selection of composite is made for primary growth of a preferred cell type, throughout voids created by degraded matrix or fibre respectively, according to the desired healing or reconstruction locus.</p>		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 98/02399

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61L27/00 A61L31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 108 755 A (A.U. DANIELS ET AL.) 28 April 1992 cited in the application see claims 3-10	1-28
Y	EP 0 192 068 A (THE DOW CHEMICAL COMPANY) 27 August 1986 see page 7, line 29 - line 33; claim 1 -/--	1-28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date, or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 March 1999

Date of mailing of the international search report

06/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No

PCT/GB 98/02399

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 125, no. 2,  8 July 1996  Columbus, Ohio, US;  abstract no. 12759,  XP002097606  cited in the application  see title  &amp; C.D. RUDD ET AL.. EDITORS: "Liquid  molding technology: a guide to RTM, SRIM  and related composites processing  techniques "  1996 , WOODHEAD , CAMBRIDGE UK  -----</p>	1-28

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/GB 98/02399

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5108755 A	28-04-1992	CA 2031529 A EP 0422208 A JP 3505541 T WO 9012605 A	28-10-1990 17-04-1991 05-12-1991 01-11-1990
EP 192068 A	27-08-1986	US 4636526 A US 4634720 A AU 589393 B AU 5266186 A CA 1290881 A JP 61193666 A US 4842604 A US 5007930 A US 4698375 A US 4661536 A	13-01-1987 06-01-1987 12-10-1989 28-08-1986 15-10-1991 28-08-1986 27-06-1989 16-04-1991 06-10-1987 28-04-1987